

Mychelle Carneiro Santana

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIGALACTURONASES EXPRESSAS
NO SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Callosobruchus maculatus*
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres
Silva

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santana, Mychelle Carneiro

Identificação de poligalacturonases expressas no sistema digestório de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) / Mychelle Carneiro Santana ; orientador, Carlos Peres Silva - Florianópolis, SC, 2013. 66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Poligalacturonase. 3. *Callosobruchus maculatus*. 4. *Vigna unguiculata*. 5. Bioquímica. I. Silva, Carlos Peres. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer:

A Deus primeiramente, pela vida e pelas oportunidades que coloca em meu caminho. Por permitir que eu sempre alcance meus objetivos, sendo meu maior confidente em todos os momentos.

Aos meus pais, Ivani Carneiro e Paulo Roberto Santana, que me guiam e apoiam mesmo à distância, sempre me encorajando a enfrentar novos desafios.

Ao professor Carlos Peres Silva, pela orientação e por me oferecer a oportunidade de crescimento profissional e pessoal em seu laboratório, e principalmente, por ser um exemplo de professor e pesquisador para seus orientandos.

Às minhas amigas, Eliane Melara, Rachel Pantalena Leal, Luana Chagas da Silva, Patrícia Schmitz e Celene Ivachuk pela amizade e cuidados nos momentos delicados.

Aos colegas de laboratório Gabriel Braga Oliveira, Daniela Faria Florencio, Daniel Alexandre e Ricardo Thomé Linhares, por compartilharem seus saberes e experiências. Em especial às minhas amigas Daniele Kunz e Roseane Panini, por seu afeto e por serem sempre solícitas.

Aos professores Boris Stambuk e Hernán Terenzi, e suas equipes, por gentilmente cederem auxílio e espaço em seus laboratórios durante algumas etapas de desenvolvimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade de desenvolvimento profissional.

À Capes, CNPq e FAPESC pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As paredes celulares das plantas contêm uma complexa mistura de polissacarídeos e proteínas, demandando uma série de enzimas para degradá-las. Organismos capazes de secretar enzimas de degradação podem aproveitar as paredes celulares como fonte de nutrientes, agindo como verdadeiros patógenos vegetais, gerando perdas nas produções agrícolas e consequentemente à economia. A busca por novas técnicas de controle de pragas tem impulsionado estudos baseados na sua biologia, visando diminuir o uso de substâncias químicas, sabidamente prejudiciais ao meio ambiente e aos consumidores. Trabalhos anteriores detectaram sequências gênicas supostamente codificadoras de poligalacturonases em larvas de *C. maculatus*, besouro praga do feijão caupi. Estas enzimas degradam o ácido poligalacturônico (PGA) presente na matriz de pectina na parede celular vegetal. A partir destes dados, investigamos se os genes estavam sendo expressos e se as enzimas tinham atividade funcional no animal. Amostras de homogeneizados intestinais do inseto foram ensaiadas contra PGA em teste de difusão radial, onde a atividade detectada foi proporcional à quantidade de amostra aplicada, demonstrando que a enzima além de ser expressa, é também funcional. A distribuição espacial da enzima foi ensaiada através da dosagem dos açúcares redutores, cujo tampão mais adequado foi o citrato-fosfato, com atividade ótima no pH 6,5. Os resultados mostraram maior atividade nas amostras do conteúdo luminal, confirmando que a enzima é secretada no intestino do inseto, embora os valores das atividades absoluta e específica tenham se mostrado baixos. SDS-PAGE foi preparado para confirmação do número de isoformas encontradas em estudos anteriores. Apenas duas isoformas foram detectadas, com formação de bandas em diferentes faixas de pHs. Atividade da enzima pectinase também foi ensaiada através do teste de difusão radial contra pectina, apresentando atividade e proporcionalidade em relação à quantidade de amostra aplicada, constituindo um novo ponto a ser abordado na espécie quanto às enzimas celulolíticas.

Palavras-chave: Poligalacturonase, *Callosobruchus maculatus*, *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Plant cell walls contain a complex mixture of proteins and polysaccharides, requiring a number of enzymes to degrade them. Organisms capable of secreting enzymes active on the cell wall constituents can use it as a source of nutrients, acting as true plant pathogens, generating losses in agricultural production and consequently in the economy. The search for new methods of pest control has driven studies based on their biology, aiming to reduce the use of chemicals, known to harm the environment and consumers. In larvae of *Callosobruchus maculatus*, known as cowpea beetle, gene sequences encoding putative polygalacturonases were detected. These enzymes degrade polygalacturonic acid (PGA) present in the matrix of pectin in the plant cell wall. To assess if the enzymes were functional in *C. maculatus*, samples containing intestinal homogenates were tested against PGA in radial diffusion assays, where the activity detected was proportional to the amount of sample applied. The confirmation of the origin of the activity was performed using the same test, by using a cowpea flour extract, as enzyme source, which was inactive. The spatial distribution of the enzyme among the different compartments of the gut of the insect was assayed by the DNS method, whose the most suitable buffer among the tested, was citrate-phosphate, with maximum activity at pH 6.5. Results showed greater activity in the samples of luminal contents, confirming that the enzymes are secreted in the gut of the insect, although the values of absolute and specific activities have been shown very low. SDS-PAGE was prepared to confirm the number of isoforms found in the transcriptome and in the proteome of *C. maculatus*, however, only two isoforms were detected with bands at different pH values. Due to the commonly presence of genes encoding plants cell wall degrading enzymes in other members of the Chrysomelidae family, pectinase activity was also assayed in intestinal homogenates of larval *C. maculatus*. Radial diffusion assays against pectin confirmed activity and proportionality in relation to the amount of sample applied, constituting a new point to be addressed about the cellulolytic enzymes in the species.

Keywords: Polygalacturonase, *Callosobruchus maculatus*, *Vigna unguiculata*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Dimorfismo sexual na espécie <i>Callosobruchus maculatus</i> | 20 |
| Figura 2 - Ciclo de vida dos carunchos..... | 21 |
| Figura 3 - Diagrama geral da morfologia intestinal dos Coleoptera..... | 24 |
| Figura 4 - Diagrama esquemático da estrutura da parede celular vegetal..... | 27 |
| Figura 5 - Estrutura do α -D-ácido galacturônico (GalA)..... | 28 |
| Figura 6 - Esquema da estratégia experimental..... | 37 |
| Figura 7 - Efeito do pH na atividade de poligalacturonases do extrato intestinal de larvas de <i>C. maculatus</i> em diferentes tampõe..... | 43 |
| Figura 8 - Efeito do pH na atividade de poligalacturonases em gel de poli(acrilamida (PAGE) 12% co-polimerizado com PGA..... | 44 |
| Figura 9 - Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonases do intestino de <i>C. maculatus</i> contra ácido poligalacturônico..... | 46 |
| Figura 10 - Áreas dos halos de atividade de poligalacturonases dos extratos intestinais de <i>C. maculatus</i> encontrados no ensaio de difusão radial contra PGA..... | 47 |
| Figura 11 - Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonase em extratos intestinais de <i>C. maculatus</i> e de extrato da farinha das sementes de <i>V. unguiculata</i> contra ácido poligalacturônico | 48 |
| Figura 12 - Áreas dos halos de atividade de poligalacturonases dos extratos intestinais de <i>C. maculatus</i> e de extrato da farinha das sementes de <i>V. unguiculata</i> contra ácido poligalacturônico..... | 48 |
| Figura 13 - Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonases em extratos intestinais de <i>C. maculatus</i> contra pectina..... | 49 |
| Figura 14 - Áreas dos halos de atividade de pectinase dos extratos intestinais de <i>C. maculatus</i> encontrados no ensaio de difusão radial contra pectina..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Atividade enzimática de poligalacturonases presentes no epitélio e conteúdo do intestino de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 45 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS - Persulfato de amônio, do inglês, ammonium persulfate

CMC - Carboximetilcelulose

DNS - Ácido 3',5' dinitrosalicílico

GalA - Ácido galacturônico, do inglês, D - galacturonic acid

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês, polyacrylamide gel electrophoresis

PGA - Ácido poligalacturônico, do inglês, polygalacturonic acid

SDS - Dodecil sulfato de sódio, do inglês, sodium dodecyl sulfate

RNA_m - RNA mensageiro

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 17 |
| 1.2 <i>Callosobruchus maculatus</i> – UMA IMPORTANTE PRAGA NA AGRICULTURA..... | 19 |
| 1.3 ORGANIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM CARUNCHOS E SUA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO A INIBIDORES..... | 23 |
| 1.4 EXISTÊNCIA DE MÚLTIPLAS POLIGALACTURONASES INTESTINAIS EM <i>C. maculatus</i> | 26 |
| 1.5 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DO BIOETANOL..... | 31 |
| 2 HIPÓTESE CIENTÍFICA..... | 33 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 35 |
| 3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO..... | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 COLÔNIA DE INSETOS..... | 37 |
| 4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 38 |
| 4.3 ENSAIO DE HIDROLASES..... | 39 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 40 |
| 4.5 ENSAIO EM GEL DE POLIACRILAMIDA..... | 40 |
| 4.6 GEL DE AGAROSE PARA ENSAIO DE DIFUSÃO RADIAL..... | 41 |
| 4.7 EXTRATO DE FARINAH DE <i>Vigna unguiculata</i> | 41 |
| 4.8 CÁPSULAS ARTIFICIAIS SEM INIBIDORES DE POLIGALACTURONASES..... | 42 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |
| 5.1 EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIGALACTURONASE | 43 |
| 5.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS POLIGALACTURONASES EM <i>C. maculatus</i> | 45 |
| 5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR DIFUSÃO RADIAL..... | 46 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 51 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 57 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 59 |
| REFERÊNCIAS..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Unida ao constante crescimento demográfico das últimas décadas aumenta a preocupação em atender a demanda global por alimento, já que a produção alimentar não acompanha o crescimento geométrico da população (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Dados da Organização das Nações Unidas (2013) prevêem que em 2050 seremos 8 bilhões e 900 mil pessoas no mundo e alimentar esta população provavelmente será uma das principais preocupações da humanidade no futuro. Dentre os principais componentes da dieta humana estão as proteínas vegetais. Grãos de plantas leguminosas possuem elevado valor nutricional e são amplamente consumidos por todas as classes sociais, sendo, portanto, relevantes também quanto ao ponto de vista econômico. Procurando evitar a escassez de recursos alimentares e o agravamento da distribuição da fome no mundo, principalmente entre as populações mais carentes das nações em desenvolvimento, torna-se fundamental a busca pela redução das perdas nas lavouras e armazéns (GATEHOUSE, 1984; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Além da espécie humana, alguns coleópteros da subfamília Bruchinae também são capazes de explorar extensivamente as leguminosas, restringindo a colheita. Trabalhos relatam perdas anuais de até 30% da safra, prejudicando não somente a oferta de alimento, como também o lucro do produtor. Na tentativa de solucionar este problema, ou ao menos limitá-lo, tornou-se comum o uso desmedido de defensivos químicos, que são baseados em substâncias altamente agressivas para o ambiente, bem como para os consumidores destes cultivos agrícolas. A

manutenção desta prática ao longo de anos acabou por gerar outra desvantagem em relação à utilização destes produtos, o surgimento de organismos resistentes. Estes foram e são impropriadamente selecionados, levando à necessidade de aplicar doses cada vez maiores de pesticidas para sua eliminação (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Por esta estratégia de controle de pragas se mostrar cada vez mais danosa e dispendiosa aos produtores, hoje há um esforço para o desenvolvimento de técnicas alternativas de proteção das culturas agrícolas. Em 2008, o Fundo Internacional de Desenvolvimento Agrícola (FIDA) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) disponibilizaram juntos mais de 250 milhões de dólares para impulsionar a produção agrícola de países com prejuízos nas lavouras, incentivando, inclusive, a realização de análises que buscassem a redução das perdas nas colheitas. Técnicas alternativas, tais como a utilização de parasitoides como forma de controle biológico, já foram adotadas, mas as dificuldades de gerenciamento e seus resultados ineficientes em condições de campo levaram os estudiosos a buscar novos caminhos (RAMALHO & DIAS, 2003; ONU, 2013).

Agora estudos sobre meios de controle que focam na biologia de plantas e insetos têm se destacado nas áreas agrônoma e médica da entomologia, assim, os investimentos em pesquisas na área de interação inseto-planta têm sido cada vez mais constantes. O conhecimento sobre a organização do sistema digestório das diferentes ordens de insetos contribui com informações que podem orientar programas de melhoramento genético no desenvolvimento de novas técnicas para controle de pragas. Trabalhos anteriores demonstraram que as plantas são capazes de defender-se dos insetos através da produção de

substâncias químicas que os repelem ou intoxicam, podendo desorganizar suas funções digestivas. Baseados nestes modelos, genes que levam à expressão de proteínas potencialmente tóxicas, como os inibidores protéicos de tripsina, já foram inseridos em plantas de interesse econômico (ALSTAD & ANDOW, 1995; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; GATEHOUSE, 1984; MOSOLOV *et al.*, 2001; TERRA & FERREIRA, 2005).

Apesar da tecnologia de transferência de genes entre organismos distintos já estar bem avançada, o conhecimento de alvos a serem explorados ainda é reduzido. Por possuírem representantes adaptados a uma multiplicidade enorme de hábitos alimentares e habitats, a classe Insecta constitui um modelo riquíssimo de informações a ser estudado. Compreender mais a fundo suas funções digestivas tornou-se uma das mais promissoras fontes de alvos para serem explorados no desenvolvimento destas ações de controle (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; TERRA & FERREIRA, 2005).

1.2 *Callosobruchus maculatus* – UMA IMPORTANTE PRAGA NA AGRICULTURA

Estes pequenos besouros são popularmente reconhecidos como carunchos ou às vezes, de forma errônea, chamados de gorgulhos (designação que deve ser empregada somente para os curculionídeos - insetos que perfuram madeira, cereais e feijão armazenado). A espécie infesta a *Vigna unguiculata*, um tipo de planta leguminosa comestível da família das Fabaceae, comumente conhecida como feijão-de-corda, feijão-fradinho ou feijão caupi e amplamente consumida como alimento

básico por famílias menos favorecidas no Brasil e na África (CREDLAND, 1987).

Esses insetos-praga foram primeiramente descritos em 1775 por Fabricius. Da ordem dos Coleoptera e da superfamília Chrysomeloidea, foram recentemente reclassificados, deixando a antiga família dos bruquídeos e passando a compor a família Chrysomelidae, mais especificamente a subfamília Bruchinae. Sua origem é atribuída ao Velho Mundo, provavelmente no continente africano e acredita-se que sua distribuição extensa e descontínua se deu através do transporte comercial dos grãos que a espécie ataca (SINGH & RACHIE, 1985; FREIRE- FILHO, 1988).



Figura 1 - Dimorfismo sexual na espécie *Callosobruchus maculatus*: a) Macho b) Fêmea. Fonte: Oliveira (2013).

Medindo aproximadamente 3 mm de comprimento, apresentam em seus élitros manchas amarronzadas que formam um “x”, como pode ser observado na Figura 1. O dimorfismo sexual é facilmente detectável através das duas listras escuras presentes na parte posterior do abdômen da fêmea (Figura 1 - B), enquanto nos machos se observa o abdômen

com cor clara e mais uniforme, conforme visto na Figura 1 - A (DOMENICHINI, 1951; SANTOS, 1971).

O ciclo biológico destes besouros se inicia quando a fêmea deposita individualmente os ovos sobre a superfície dos grãos estocados sob condições ordinárias (Figura 2 - A), ou mais raramente, sobre a vagem da leguminosa no campo.

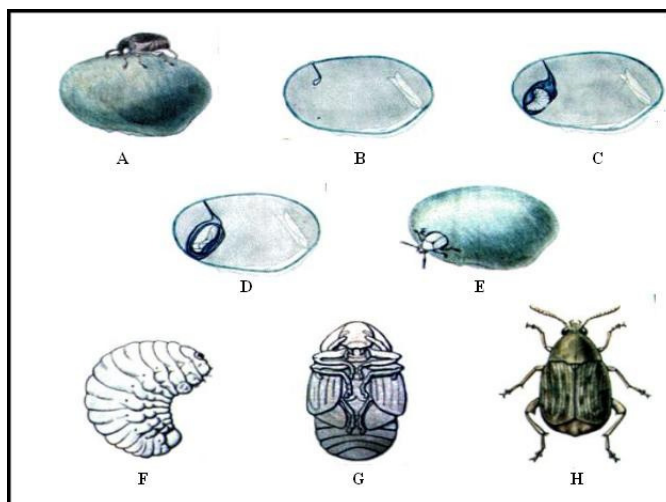


Figura 2 - Ciclo de vida dos carunchos: o diagrama mostra os estágios de desenvolvimento do caruncho do feijão. A – Fêmea fecundada ovipositando sobre o grão de feijão; B – Larva atravessando o tegumento da semente; C – Larva se alimentando e preparando para metamorfose; D – Pupa durante a metamorfose; E – Adulto emergindo do grão de feijão; F – Forma larval; G – Forma de pupa; H – Forma adulta. Fonte: Silva *et al.* (1999).

Em ambos os casos a larva eclode do ovo em até uma semana e atravessa o tegumento da semente em direção ao interior do grão (Figura 2 - B). Já dentro do cotilédone do feijão, o animal se alimenta de seu conteúdo para suprir suas necessidades nutricionais e desse modo forma galerias por onde se movimenta (Figura 2 – C). Neste ambiente o animal

realiza metamorfose completa (Figura 2 – B, C, D, E), passando por quatro ínstares larvais e pelas fases de pré-pupa, pupa (Figura 2 – G) e adulto (Figura 2 – H). Durante o quarto instar, a larva consome a superfície interna do tegumento do feijão, preparando um orifício circular conhecido como janela pupal, por onde emergirá facilmente quando estiver na forma adulta.

Após a emergência (Figura 2 – E), os adultos já estão aptos para procriar, podendo a cópula se realizar poucos minutos depois e a oviposição pela fêmea fecundada até na hora seguinte. A fêmea tem comportamento de reprodução poliândrico (acasala com mais de um macho), sendo capaz de dispersar aproximadamente 80 ovos entre os grãos ao longo de sua existência (CREDLAND, 1987).

Todo o processo de desenvolvimento até a forma adulta leva em torno de 30 dias (Figura 2 – B, C, D, E) e o tempo de sobrevivência do inseto após a emergência é de 15 a 30 dias. O fato deles não apresentarem aparelho bucal funcional na idade adulta (áfagos - não se alimentam e nem bebem água na idade adulta), explica o efêmero tempo de vida e resulta no direcionamento de toda sua energia para reprodução. Esse fator também favorece a expansão da espécie em ambientes secos, como é característico nos locais de estocagem de sementes (REDDEN et al., 1983).

Nos anos 80, durante 8 anos, a Nigéria incentivou a realização de estudos sobre os estragos causados por *C. maculatus* e foi estimado que os prejuízos devido à presença do inseto atingiam em torno de 30 mil toneladas ao ano. Danos decorrentes da penetração e alimentação das larvas nas sementes geram perdas muito significativas na qualidade do produto, com diminuição da sua massa, valor nutritivo e viabilidade

do feijão como semente. As imperfeições e o insuficiente grau de higiene são mal aceitos pelos consumidores, o que reduz também seu valor comercial (JACKAI & DAOUST, 1986).

Para o controle das infestações a EMBRAPA orientada aos produtores rurais que mantenham limpos os armazéns e monitorem os grãos, impedindo o acesso das fêmeas através da utilização de silos. Recomenda-se também a aplicação de inseticida quando se fizer necessário.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM CARUNCHOS E SUA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO A INIBIDORES

A digestão é um processo em que macromoléculas de alimento são degradadas em moléculas menores passíveis de serem absorvidas no tecido intestinal para o desenvolvimento regular do organismo (GUYTON & HALL, 2006).

O sistema digestório dos insetos é adaptado às condições de cada grupo e suas especificidades, variando mais conforme sua posição filogenética do que quanto ao seu hábito alimentar (TERRA, 1990). O aparelho digestivo é basicamente formado por um longo tubo que percorre o corpo do animal no sentido longitudinal e está dividido em 3 regiões: anterior (onde ocorre o processamento inicial do alimento), médio (realiza secreção de enzimas, hidrólise e absorção dos produtos da hidrólise) e posterior (onde se dá a formação e o armazenamento das fezes e a absorção da água) (RUPPERT et al., 2005).

Nos carunchos a morfologia intestinal é bastante simples (Figura 3), onde se observa o intestino anterior bem reduzido, incluindo apenas a boca com glândulas salivares, a faringe e o esôfago. As

estruturas apresentam revestimento cuticular para impedir absorção de moléculas hidrofílicas nesta região. Já o ventrículo, cuja função é manter simbioses e ampliar a área de secreção e absorção, é parte do intestino médio. Com abundância de enzimas proteolíticas, possui seu epitélio composto por uma única camada de células e ao contrário da maioria dos insetos, os carunchos não apresentam membrana peritrófica, uma estrutura anatômica quitina-proteica que reveste o bolo alimentar em vários outros artrópodes. Também na parte terminal desta região se estabelecem os túbulos de Malpighi, órgãos envolvidos na excreção, que se ramificam ao redor do tubo alimentar filtrando os fluídos do organismo e levando as excretas nitrogenadas até o intestino para serem eliminadas junto às fezes. (VATS, 1976; MICHAUD *et al.*, 1995; PANIZZI, 2012).

Na área posterior do intestino encontram-se o íleo, o cólon e o reto. Nos carunchos sua estrutura se resume a um tubo retilíneo que termina no ânus, como pode ser observado na figura 3. Aqui ocorrem tanto absorção residual, como a formação do bolo fecal (PANIZZI, 2012).

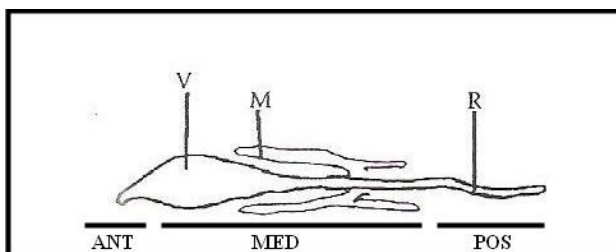


Figura 3 - Diagrama geral da morfologia intestinal dos Coleoptera: V = ventrículo; M = tubos de Malpighi; R = reto; ANT = intestino anterior; MED = intestino médio; POS = intestino posterior. Fonte: Terra & Ferreira (2009).

Maiores detalhes acerca da digestão molecular vêm sendo elucidados, mas não estão completamente esclarecidos. Estudos demonstram que a exposição de insetos a inibidores de enzimas digestivas (produzidos pelas plantas como forma de defesa contra ao ataque de pragas) pode resultar na adaptação dos insetos. Como resposta à presença destes inibidores eles passam a produzir proteinases e amilases digestivas, parcial ou totalmente insensíveis a estes inibidores, ou ainda, expressam proteinases capazes de degradar o próprio inibidor, como observado em larvas de *Zabrotes subfasciatus*, outro caruncho muito próximo filogeneticamente ao *C. maculatus* (TERRA *et al.*, 1979; SILVA *et al.*, 2001).

O inseto costumeiramente se alimenta e digere o vegetal com o intuito de repor suas reservas energéticas. Quando a planta contém um inibidor, este age inicialmente fazendo a inibição das enzimas digestivas pré-existentes no animal. A diminuição na quantidade de aminoácidos livres passíveis de serem absorvidos no intestino do caruncho, o leva a aumentar a quantidade de alimento ingerido, elevando consequentemente a quantidade de inibidor presente no seu aparelho digestório. De algum modo seu aparato molecular reconhece o inibidor e deixa de expressar a enzima inicialmente inibida, passando a expressar novas enzimas insensíveis ao inibidor ingerido, conseguindo assim retomar a reposição de sua reserva energética (TERRA, 1988; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991; BIFANO *et al.*, 2010).

Representantes da família Chrysomelidae ao invés de proteinases serínicas, apresentam proteinases cisteínicas e aspárticas como enzimas digestivas, o que sugere que seu ancestral era adaptado a se alimentar de sementes, já que estas são ricas em inibidores de

proteínases serínicas (TERRA, 1988; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991; TERRA & FERREIRA, 1994). Trabalhos recentes demonstraram que larvas de *C. maculatus* são capazes de expressar novas catepsinas B, quando desafiadas a ingerir alimento associado ao inibidor desta protease cisteínica (KOO *et al.*, 2008). A indução também ocorre para as catepsinas D, proteases aspárticas minoritárias no intestino médio (AHN & ZHU-SALZMAN, 2009).

A notável diversidade e plasticidade das proteases expressas se dá devido às enzimas de digestão inicial serem poligênicas, permitindo que os insetos se defendam de uma variedade de toxinas e compostos antinutricionais produzidos pela planta hospedeira, reajustando seu processo de digestão aos desafios da dieta, o que é crucial para sua sobrevivência (SILVA *et al.*, 1999; AHN *et al.*, 2007; CHI *et al.*, 2009).

O conhecimento sobre o evento da adaptação dos insetos a seus inibidores proporciona a possibilidade de utilizar este fenômeno como mecanismo de controle das infestações. Com isso, a busca por novos genes que envolvam a expressão de inibidores capazes de bloquearem o desenvolvimento dos carunchos continua cativante, tanto quanto conhecer mais a fundo seus mecanismos de ação e suas propriedades moleculares.

1.4 EXISTÊNCIA DE MÚLTIPLAS POLIGALACTURONASES INTESTINAIS EM *C. maculatus*.

As células das plantas apresentam sua membrana plasmática revestida pela parede celular, uma estrutura rígida formada por uma mistura complexa de polissacarídeos e proteínas, que delimita a célula e determina sua arquitetura. Além de conferir suporte físico, sustentando a

estrutura do vegetal, também fornece proteção mecânica na defesa contra ataques de patógenos (DE ROBERTS & HIB, 2001).

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal. Constituída por uma cadeia de monômeros de glicose, seus polímeros se organizam em microfibrilas e estas se entrelaçam para formar filamentos delgados que se associam. O arcabouço de celulose é preenchido por uma matriz amorfa não celulósica, constituída principalmente por hemicelulose e pectinas (Figura 4). A primeira é formada por polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, podendo ser linear ou ramificada, intercalando-se às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio. Já as pectinas são características das primeiras camadas da parede celular (parede primária) e também da substância intercelular (lamela mediana), formando uma fase gel hidratada onde se implanta a rede celulose-hemicelulose, participando da manutenção da adesão entre as células (RAVEN *et al.*, 2007).

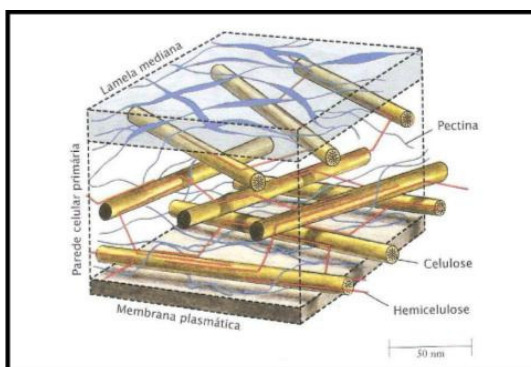


Figura 4 - Diagrama esquemático da estrutura da parede celular vegetal: A figura mostra as microfibrilas de celulose interligadas às moléculas de hemicelulose formando uma complexa rede, permeada por pectinas. A lamela mediana trata de uma camada rica em pectina que une as paredes primárias das células adjacentes. Fonte: Raven *et al.* (2007).

A pectina é composta por um grupo heterogêneo de polissacarídeos, contendo caracteristicamente açúcares neutros (ramnose, arabinose e galactose) e açúcares ácidos (ácido galacturônico). O homogalacturonano, também conhecido como ácido péctico ou ácido poligalacturônico, é um exemplo de polissacarídeo péctico de estrutura simples, formado por resíduos de ácido α - D - galacturônico (Figura 5), um açúcar de seis carbonos parcialmente esterificado com grupos metoxila (TAIZ & ZEIGER, 2004; COSGROVE, 2005).

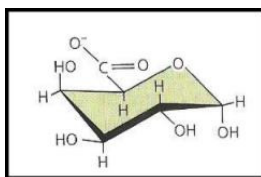


Figura 5 - Estrutura do α - D - ácido galacturônico (GalA): o polímero destes resíduos formam o ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Fonte: Taiz & Zeiger (2004).

Alguns organismos têm se tornado eficientes no aproveitamento dos componentes das paredes celulares das plantas como fonte de nutrientes para seu desenvolvimento, comportando-se como patógenos efetivos destes vegetais. Os exploradores secretam algumas enzimas para degenerar as paredes, dentre elas, as poligalacturonases. Estas enzimas fazem parte de uma família multigênica de glicosídes e são responsáveis por catalisar a hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 entre os ácidos galacturônicos que formam a cadeia de pectina, desmetilando o carbono 6 do grupo carboxílico, contribuindo assim, para a desassociação das células da parede (JUGE, 2006).

A classificação das enzimas digestivas e o sistema de números utilizado seguem os padrões do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Nomenclature Committee - 1992). As glicosidases (EC 3.2) são classificadas de acordo com seu substrato específico e são divididas em categorias conforme suas funções. As poligalacturonases (EC 3.2.1.15) catalisam as hidrólises randomicamente e podem receber as seguintes denominações: pectina despolimerase, pectinase, pectolase, endopoligalacturonase, pectina hidrolase, glicanohidrolase e endo-D-galacturonase. A exopoligalacturonase (EC 3.2.1.67) também atua na hidrólise do ácido péctico, mas a partir de extremidades não redutoras, liberando digalacturonato. As poligalacturonases, assim como as demais glicosidases ou glicosil hidrolases, também podem ser classificados em famílias de acordo com homologia de sequências, sendo as poligalacturonases para *C. maculatus* já descritas e classificadas como pertencentes à família GH 28 (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996; CANTAREL *et al.*, 2009, PAUCHET *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Estas pectinases estão presentes em diversos ordens de insetos, todavia informações detalhadas em relação a sua importância para estes organismos são muito limitadas, já que nos últimos anos foi dada maior ênfase a estudos sobre sua relação com microorganismo simbiotes e a relevância da microflora intestinal (DOOSTDAR *et al.*, 1997). Desde que surgiram, há mais de 285 milhões de anos, os besouros ocupam diversos nichos ecológicos e estabeleceram associações com diversos grupos de plantas, o que inclusive pode ter garantido o sucesso do grupo. Investir na busca por conhecimento neste campo inexplorado

pode elucidar, inclusive, como se deu o sucesso da espécie ao longo da evolução (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996).

Baseado na escassez de dados sobre estas enzimas em *C. maculatus*, Pedra e colaboradores (2003) deram início aos estudos nessa área através da análise de transcriptoma da espécie e inferiram a presença de genes codificadores de diversas enzimas digestivas, tendo uma delas 29% de identidade com sequências que codificam poligalacturonases.

Em 2010, Pauchet e seus colaboradores confirmaram via pirosequenciamento a presença de 7 sequências que caracterizavam enzimas pectinolíticas da família GH 28 em amostras de intestino médio de *C. maculatus*. Ainda nesse trabalho foram detectadas sequências semelhantes em outros representantes dos crisomelídeos, muito próximos aos carunchos, mostrando que os genes ou regiões de genes se apresentam bem conservados no grupo. O fato nos indica que provavelmente a presença das poligalacturonases seja uma herança genética de ancestrais que ainda não foi perdida pela espécie.

Não convencidos somente pela identificação de sequências de RNAm para estes genes, que ainda poderiam sofrer controle pós-transcricional, no ano de 2012 Nogueira e colaboradores decidiram investigar se os genes estavam de fato sendo traduzidos. No proteoma foram encontradas diversas carboidrases e dentre elas, o grupo das poligalacturonases da família GH 28 foi o que apresentou maior diversidade de isoformas distintas. Entre amostras de epitélio e conteúdo de intestinos de *C. maculatus* foram detectados 7 tipos, confirmando os resultados encontrados por Pauchet e colaboradores em 2010. A presença de tantas isoformas pode estar ligada a uma resposta adaptativa

dos insetos às famílias multigênicas de inibidores produzidos pelas plantas, que buscam através da modulação da expressão gênica defender-se de suas pragas.

Apesar dos dados obtidos até o momento serem de grande relevância, ainda carecemos de esclarecimentos sobre a importância dessas enzimas para o *C. maculatus*. A indisponibilidade de dados na literatura a este respeito incentivou nosso grupo a mensurar as atividades enzimáticas de poligalacturonases e inferir sua influência no inseto.

1.5 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DO BIOETANOL

O maior conhecimento sobre o poder de ação das enzimas pode abrir campos de atuação muito amplos cientificamente. Estudos relacionados às enzimas celulolíticas e pectinolíticas, como as poligalacturonases, têm sido cada vez mais comuns no setor da biotecnologia, que procura por organismos bons produtores de oligossacarídeos. O interesse neste tipo de enzima está relacionado à possibilidade de utilizar os genes que as codificam em determinado organismo, para serem expressos em grande escala (através de técnicas adequadas de biologia molecular) a fim de melhorar o aproveitamento da biomassa na produção do bioetanol (ÖHGREN *et al.*, 2006).

O etanol de primeira geração é produzido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar. Este processo gera uma quantidade excessiva de bagaço, um resíduo altamente poluente que não tem destino certo, mas que geralmente é queimado em termelétricas. Trabalhos recentes tratam este resíduo utilizando um complexo de enzimas de degradação de parede celular, a fim de romper estruturas celulares da planta, facilitando a fermentação do bagaço hidrolisado para

a produção de mais etanol, o chamado etanol de segunda geração ou bioetanol, que tem se destacado como alternativa de combustível renovável, barato e pouco poluente (TORTORA *et al.*, 2005).

Este processo além de melhorar o aproveitamento da matéria-prima do etanol, diminui a quantidade de resíduo e as áreas de cultivo, minimizando problemas ambientais. Estudar as atividades enzimáticas das poligalacturonases em *C. maculatus* auxiliará na inferência da espécie como boa produtora de pectinase, podendo futuramente vir a ser utilizada neste processo (PANDEY *et al.*, 2000).

2. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Com base no exposto, nossas hipóteses de trabalho foram:

- O desenvolvimento de novos controles de infestações através da inibição enzimática da poligalacturonase secretada por *Callosobruchus maculatus*, impedindo assim, que ocorra a degradação da parede celular vegetal e logo a disseminação da espécie entre os grãos de *Vigna unguiculata*.
- O emprego adequado da poligalacturonase como enzima pectinolítica para o melhor aproveitamento da biomassa na produção de bioetanol.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral contribuir para o entendimento sobre a importância das poligalacturonases no processo de digestão de *Callosobruchus maculatus*.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

O emprego adequado da poligalacturonase como enzima pectinolítica para o melhor aproveitamento da biomassa na produção de bioetanol. Identificar e quantificar atividade de poligalacturonases em homogeneizados intestinais de *C. maculatus*, provendo informações quanto ao número e distribuição espacial da enzima nos diferentes compartimentos do intestino do caruncho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para contemplar nossos objetivos os ensaios foram realizados de acordo com a estratégia experimental (Figura 6).



Figura 6 – Esquema da estratégia experimental: Os ensaios foram realizados seguindo os passos apresentados acima. Fonte: A autora (2013).

Seguem descritos em detalhes os ensaios realizados:

4.1 COLÔNIA DE INSETOS

A colônia contendo larvas e adultos de *C. maculatus* teve seu início com animais fornecidos pelo Dr. J.H.R. Santos, da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, na década de 80. Posteriormente, em 1994, culturas estoque foram estabelecidas na Universidade Estadual do Norte Fluminense, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro e desde então, são mantidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos em Florianópolis – Santa Catarina.

Os besouros são criados em frascos de vidro transparente ocluídos com tampa, contendo sementes de *Vigna unguiculata* (cultivar

Fradinho), adquiridas no comércio local e previamente congeladas a -20°C , a fim de eliminar qualquer infestação anterior de campo. A colônia é mantida em fotoperíodo natural, numa sala climatizada com temperatura de $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65 \pm 5\%$.

Diariamente são utilizadas em torno de 20 fêmeas para infestar as sementes e ovipositar sobre a superfície dos grãos. Após um período médio de 24 horas, as mesmas são desprezadas e suas larvas seguem desenvolvendo-se no interior das sementes (SILVA *et al.*, 1999).

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a preparação do homogeneizado de intestinos foram utilizadas larvas no quarto ínstar de desenvolvimento, com cerca de 18 dias de vida. Estas foram retiradas do cotilédone do grão, com uma pinça de inox e imobilizadas por resfriamento. A dissecação para a remoção do trato digestório ocorreu com auxílio de um estereomicroscópio, em solução salina (NaCl 250 mM) mantida em gelo.

Para os ensaios de determinação do pH ótimo, eletroforese em gel e teste de difusão radial o intestino do animal foi removido inteiro e homogeneizado com um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, mantendo-se o material constantemente em banho de gelo. O volume da amostra foi ajustado a 500 μL com água destilada e centrifugado a 20000 g por 30 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e usado como fonte de enzimas, enquanto o sedimento (fração de membrana) foi descartado.

Nos ensaios de atividade enzimática e distribuição espacial (epitélio e conteúdo), após a remoção do intestino inteiro, os tecidos

adjacentes indesejáveis foram removidos. Em seguida, o epitélio foi separado e o conteúdo luminal coletado e disperso em água destilada num volume conhecido (500 μ L). O epitélio, depois de liberto do conteúdo luminal por lavagem em NaCl 250 mM, foi homogeneizado em água destilada utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, imerso em gelo. O homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos, a fração solúvel foi coletada e a fração de membrana foi novamente homogeneizada em água destilada (Silva *et al.*,1999).

4.3 ENSAIO DE HIDROLASES

Todos os ensaios foram realizados a 37 °C. Atividades de poligalacturonases [sobre o ácido poligalacturônico (PGA), 1%, m/v] foram mensuradas pela determinação do aumento de grupos redutores no meio, em tampão de hidrólise citrato-fosfato 100 mM pH 6,5, utilizando ácido galacturônico (0,1g em 50mL de água destilada) como padrão. Para a determinação do pH ótimo das carboidrases foram utilizados três tampões: citrato-fosfato 100 mM, acetato de sódio 100 mM e fosfato 100 mM, com valores de pH variando de 3-7, em intervalos de 0,5 unidades de pH.

Nos ensaios foram usados 0,025mL de fonte de enzima e 0,025mL do substrato PGA, sendo ambos incubados em banho-maria por pelo menos 4 períodos diferentes de tempo para a construção de uma curva de atividades. A reação foi paralisada com a adição de 100 μ L de ácido dinitrosalicílico (DNS) e fervura por 5 minutos para acelerar a reação. Em seguida mais 100 μ L de água destilada foram adicionados. Para a leitura, foram retirados 200 μ L de cada tubo e aplicados em placa transparente de 96 poços. As absorbâncias resultantes foram lidas a 550

nm no aparelho de leitura de placa Tecan (Infinite) e as taxas de hidrólise calculadas. A atividade foi normalizada e apresentada em %, com cálculo da atividade máxima em pH 6,5. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato/min. Pequenas quantidades de enzimas são expressas em miliunidades (mU).

4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

As proteínas foram determinadas seguindo o método de Bradford (1976), utilizando solução de ovoalbumina como padrão

4.5 ENSAIO EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para identificar as isoformas de poligalacturonases expressas no intestino de *C. maculatus*, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), conforme estabelecido por Laemmli (1970), utilizando sistema de mini-géis BioRad MiniProtean 3, com placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm.

Para o ensaio foi utilizado gel de empilhamento 4% e gel de separação a 12 %. As amostras foram submetidas à corrida eletroforética refrigerada a 150 V, até que a linha de frente do corante saísse totalmente do gel, correspondendo a um período de aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Após migração, os géis foram transferidos para uma solução aquosa de Triton X-100 2,5 % (m/v) por 20 minutos, para renaturação das enzimas. Depois desse período, os géis foram incubados em banho-maria por 7 horas a 37 °C em tampão (citrato-fosfato 100 mM), com pH

variando de 3-7 e intervalos de 0,5 unidades de pH. A revelação do gel foi feita com corante Vermelho de Rutênio (0,05%) por 20 minutos, que foi descorado até que surgissem bandas bem contrastadas.

4.6 GEL DE AGAROSE PARA ENSAIO DE DIFUSÃO RADIAL

Para testar a presença de atividade enzimática de enzimas de degradação de parede celular vegetal em homogeneizados intestinais de *C. maculatus*, foi produzido gel de agarose utilizando ágar a 1%, com substratos (PGA e Pectina) a 0,1%, em tampão citrato-fostato 100 mM (pH 6,5). A mistura foi aquecida em micro-ondas até a completa fusão do ágar e então 15 mL da solução de gelatina foram despejados em placas de Petri descartáveis. Após a solidificação do gel, os furos foram confeccionados e os homogenatos intestinais aplicados nos poços, sendo tampão utilizado como controle negativo. Posteriormente as placas foram incubadas a 38° C por 24 horas. A revelação foi feita com o corante Vermelho de Rutênio (0,5%), aplicado por 20 minutos e descorado até o surgimento de halos de atividade bem contrastados. Para calcular a área dos halos de atividade no gel foi utilizado o software Image J.

4.7 EXTRATO DE FARINHA DE *Vigna unguiculata*

Para avaliar se as atividades de poligalacturonases encontradas realmente originavam de enzimas digestivas do inseto e não de enzimas presentes na semente de *Vigna unguiculata*, foi preparado extrato das sementes. Os grãos foram descascados manualmente e moídos em seguida em moedor comum, até a formação de um pó fino. Pesaram-se 2 g da farinha elaborada e as mesmas foram usadas para extração em 20 mL de água destilada, sob refrigeração (4°C) e agitação constante

durante 2 horas. A amostra foi então centrifugada a 20.000 g por 30 minutos e a fração solúvel coletada.

4.8 CÁPSULAS ARTIFICIAS SEM INIBIDORES DE POLIGALACTURONASES

Para eliminar possíveis inibidores de poligalacturonases ingeridos pelas larvas de *C. maculatus* do grão comercial de *V. unguiculata*, foram confeccionadas cápsulas artificiais de gelatina contendo 50% de amido de arroz (SIGMA), misturados a 15% de ovoalbumina (fonte proteica) e 35% de pectina (SIGMA). As larvas de quarto ínstar foram retiradas do cotilédone do grão e transferidas para as cápsulas, onde permaneceram por 24 horas antes de serem dissecadas.

5. RESULTADOS

5.1 O EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIGALACTURONASE

Primeiramente foi analisada a influência do pH na atividade de poligalacturonase através da dosagem de açúcares redutores pelo método DNS. Buscando encontrar o tampão mais adequado para mensurar a atividade desta enzima nos homogeneizados intestinais de *C. maculatus*, foram testados três tampões distintos (citrato - fosfato 100 Mm, acetato de sódio 100 Mm e fosfato 100 Mm) para o mesmo pool de amostra, como pH variando de 3,0 a 8,0, em intervalos de 0,5 unidades de pH. As incubações foram realizadas em 4 tempos diferentes e as atividades calculadas.

A Figura 7 mostra as atividades enzimáticas em cada tampão conforme suas faixas de tamponamento. É possível observar que o tampão citrato – fosfato apresentou maior atividade que os demais, sendo o pH 6,5 considerado o pH ótimo.

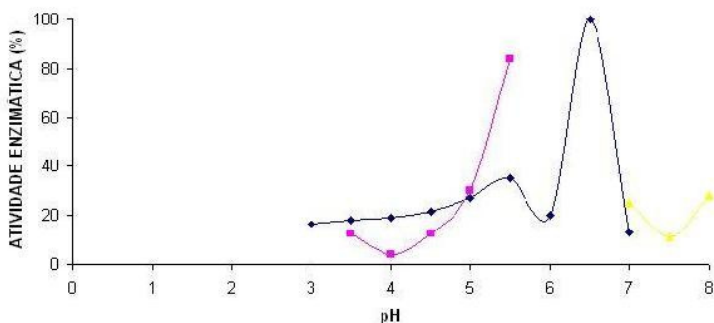


Figura 7 – Efeito do pH na atividade de poligalacturonases do extrato intestinal de larvas de *C. maculatus* em diferentes tampões: (◆) citrato - fosfato 100mM, (■) acetato de sódio e (●) fosfato. Os dados dos três tampões correspondem ao mesmo pool de amostra. Foi aplicado o equivalente a 7,5 intestinos em cada tubo. 100% corresponde a 22,42 mU/ animal. Fonte: O autor (2013).

Outro parâmetro analisado foi o efeito do pH na atividade de poligalacturonases. O ensaio a seguir (Figura 8) corresponde a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% co-polimerizado com ácido poligalacturônico 1%, incubado por 7 horas em tampão citrato-fosfato, com pH variando de 3,0 a 7,0, em intervalos de 0,5 unidades de pH.

Na Figura 8 é possível verificar a presença de duas bandas de atividade enzimática (negativa), o que sugere a existência de mais de uma poligalacturonase no extrato bruto do homogeneizado intestinal de *C. maculatus*. Esta ideia é reforçada quando se observa que as atividades enzimáticas de cada banda compreendem faixas distintas de pH. A primeira banda apresenta atividade desde o pH 3,0 até o pH 5,0, sendo sua atividade mais intensa no pH 4,0. Já a segunda exibe atividade na faixa que vai do pH 3,5 ao 4,5, tendo sua atividade otimizada também no pH 4,0. As raias dos géis incubados nos pHs 6,5 e 7,0 não apresentaram nenhuma atividade.

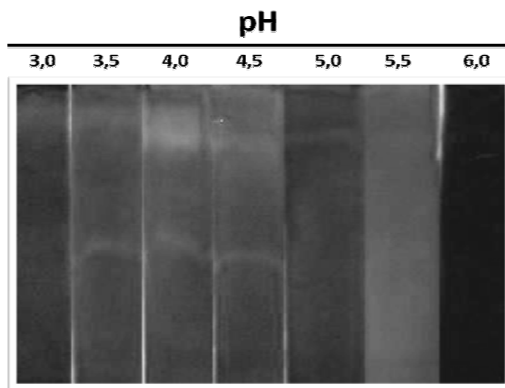


Figura 8 – Efeito do pH na atividade de poligalacturonases em gel de poliacrilamida (PAGE) 12% co-polimerizado com PGA: os dados mostram detecção de atividade de poligalacturonases de um mesmo extrato de intestinos de larvas de *C. maculatus* em diferentes pHs. Cada raia teve aplicado o equivalente a 6 intestinos. Para revelação foi utilizado vermelho de rutênio. Fonte: O autor (2013).

Também foram testados homogeneizados brutos de *C. maculatus* em PAGE 12% co-polimerizado com carboximetilcelulose (CMC) 1%, polímero derivado de celulose, mas nenhuma atividade foi encontrada.

5.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS POLIGALACTURONASES EM *C. maculatus*

A distribuição espacial de poligalacturonases entre o epitélio intestinal e o conteúdo luminal das larvas de *C. maculatus* foi mensurada através do ensaio de hidrolases (atividade absoluta) e pela determinação de proteína (atividade relativa), apresentando-se desigual em ambas. As atividades dessa carboidrase envolvida no processo de digestão de pectina são maiores na fração solúvel luminal do que no intestino, o que nos assegura que a enzima é secretada no lúmen intestinal (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade enzimática de poligalacturonases presentes no epitélio e conteúdo do intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus*.

| Epitélio | | Conteúdo luminal |
|----------------|--------------------|------------------|
| Fração solúvel | Fração de membrana | |
| 8,5 (62,7) | 7,3 (50,2) | 29 (178,4) |

Fonte: O autor (2013).

Nota: os resultados estão apresentados em atividades absolutas (mU/animal) nos diferentes compartimentos do intestino e suas atividades específicas estão exibidas entre parênteses como mU/ mg de proteína. Os números são médias calculadas de quatro repetições independentes preparadas a partir de 20 animais. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1µmol de ácido galacturônico/min.

Para analisar se havia influência de inibidores presentes na semente do feijão consumido pelo *C. maculatus* no ensaio anterior, 20 larvas foram retiradas do cotilédone e transferidas para cápsulas artificiais contendo alimento sem inibidores de PGA, onde permaneceram por 24 horas. Apesar das larvas se conservarem vivas até o momento do ensaio, as mesmas deixaram de se alimentar (visualizado no pequeno conteúdo luminal), o que tornou inviável a comparação da atividade de poligalacturonase entre os dois grupos (grão de feijão/cápsula artificial sem inibidores).

5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR DIFUSÃO RADIAL

Para testar a presença de atividade enzimática de poligalacturonases em homogeneizados intestinais das larvas de *C. maculatus* foi realizado o teste de difusão radial com gel de agarose. A Figura 9 mostra que existe uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de amostra aplicada e o tamanho do halo de atividade, como pode ser observado nos poços B e C (áreas claras), nos quais as quantidades equivalentes a 3 e 6 intestinos foram aplicadas.

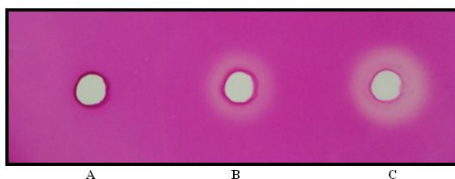


Figura 9 – Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonases do intestino de *C. maculatus* contra ácido poligalacturônico: Os halos exibidos na imagem indicam atividade de poligalacturonases nas amostras de intestino incubadas por 24 horas. A – Tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5 foi utilizado como controle (20 μ L); B - 10 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 3 intestinos); C 20 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos). Fonte: O autor (2013).

O gráfico a seguir (Figura 10) representa respectivamente as áreas dos halos de atividade de poligalacturonase encontrados no ensaio anterior (Figura 9) mensurados através do software Image J, onde é possível confirmar a existência de uma relação de proporcionalidade entre quantidade de amostra aplicada e o tamanho do halo (Figura 10 - 1B e 1C).

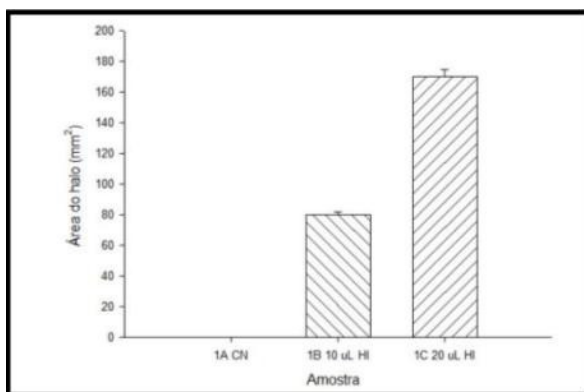


Figura 10 – Áreas dos halos de atividade de poligalacturonases dos extratos intestinais de *C. maculatus* encontrados no ensaio de difusão radial contra PGA: 1A – Controle negativo (tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5); 1B - 10 µL de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 3 intestinos); 1C - 20 µL de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos).
Fonte: A autora (2013).

Para eliminar a hipótese da atividade enzimática medida ser de poligalacturonases presentes na semente de *V. unguiculata* consumida pelo inseto e não de suas enzimas digestivas, foi produzido um extrato da farinha do feijão, também testado no ensaio de difusão radial contra PGA, onde não foi observada a formação de halo de atividade (Figura 11 - C).

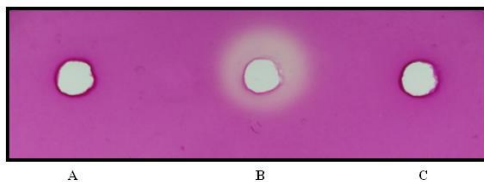


Figura 11 – Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonase em extratos intestinais de *C. maculatus* e de extrato da farinha das sementes de *V. unguiculata* contra ácido poligalacturônico: Os halos exibidos na imagem indicam atividade de poligalacturonases nas amostras de intestino incubadas por 24 horas. A - Tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5 foi utilizado como controle (20 μ L); B - 20 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos); C - 20 μ L de extrato de semente de *V. unguiculata* (contendo o equivalente a 2 mg de farinha). Fonte: A autora (2013).

O gráfico abaixo (Figura 12) representa as áreas dos halos de atividade de poligalacturonase encontrados no ensaio anterior (Figura 11), respectivamente. Observa-se que apenas a amostra do homogeneizado intestinal do caruncho apresentou atividade, confirmando que os halos visualizados nas Figuras 9 e 11 correspondem às enzimas secretadas no intestino de *C. maculatus*.

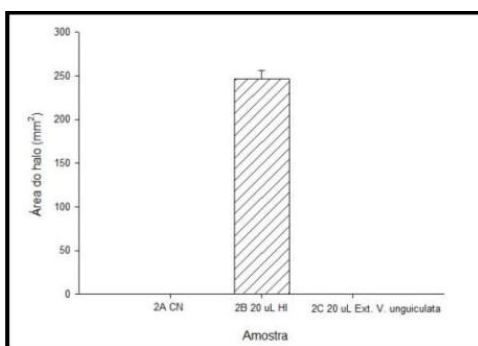


Figura 12 – Áreas dos halos de atividade de poligalacturonases dos extratos intestinais de *C. maculatus* e de extrato da farinha das sementes de *V. unguiculata* contra ácido poligalacturônico: 2A – Controle negativo (tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5); 2B - 20 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos); 2C - 20 μ L de extrato de semente de *V. unguiculata* (contendo o equivalente a 2 mg de farinha). Fonte: A autora (2013).

Procurando avaliar a atividade enzimática sobre hemicelulose além do uso de ácido poligalacturônico como substrato, outro constituinte da parede celular vegetal também foi ensaiado em homogeneizados dos intestinos das larvas de *C. maculatus*. A figura 13 mostra o ensaio de difusão radial feito com pectina, onde é possível observar que também há correlação quantitativa entre a quantidade de amostra utilizada e o diâmetro do halo de atividade.

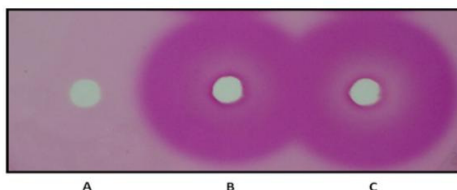


Figura 13 - Ensaio de difusão radial da atividade de poligalacturonases em extratos intestinais de *C. maculatus* contra pectina: Os halos exibidos na imagem indicam atividade de poligalacturonases nas amostras de intestino incubadas por 24 horas. A – Tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5 foi utilizado como controle (20 µL); B - 10 µL de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 3 intestinos); C 20 µL de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos). Fonte: A autora (2013).

As áreas dos halos de atividade de pectinase encontrados no ensaio anterior (Figura 13) podem ser observados na Figura 14, evidenciando a presença de outra enzima degradadora de parede celular vegetal no intestino do caruncho.

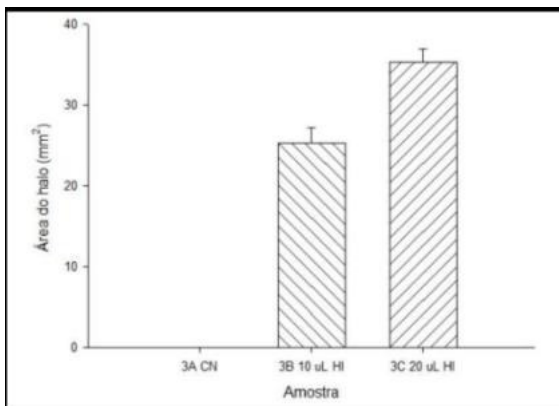


Figura 14 – Áreas dos halos de atividade de pectinase dos extratos intestinais de *C. maculatus* encontrados no ensaio de difusão radial contra pectina: 3A – Controle negativo (tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5); 3B - 10 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 3 intestinos); 3C - 20 μ L de homogeneizado de intestino (contendo o equivalente a 6 intestinos). Fonte: A autora (2013).

6. DISCUSSÃO

As poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) são enzimas que degradam o ácido poligalacturônico (polímero de ácido galacturônico), que forma a matriz de pectina da parede celular vegetal, que por sua vez constitui a primeira barreira que os patógenos vegetais precisam superar. Os organismos com capacidade de secretar estas enzimas digestivas têm o benefício de aproveitar essas paredes celulares como fonte de nutrientes (LAGAERT *et al.*, 2009).

Enzimas celulolíticas vêm sendo estudadas em vários grupos de insetos que são capazes de explorar extensivamente plantas de grande interesse econômico (DOOSTDAR *et al.*, 1997, KIRSCH *et al.*, 2012). Entretanto, algumas espécies ainda não foram suficientemente investigadas neste contexto, como é o caso do *Callosobruchus maculatus*. Este caruncho é considerado praga da *Vigna unguiculata*, atacando os grãos armazenados dessa leguminosa que compõe alimentação básica de famílias menos favorecidas das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Principalmente cultivada por pequenos agricultores e com maior produção no estado do Ceará, as infestações por estes insetos causam perdas econômicas exorbitantes. Assim, entender melhor sobre a importância dessas enzimas no processo de digestão desses insetos é determinante para o desenvolvimento de novas técnicas de controle da praga (SINGH & RACHIE, 1985; FREIRE-FILHO, 1988; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Apesar das informações encontradas em trabalhos anteriores serem significativas, um dos principais inconvenientes das análises de sequenciamento neles utilizados, reside na falta de uma ligação entre a presença de transcritos codificadores de enzimas e suas funções

fisiológicas no animal, ou seja, se realmente os genes codificam enzimas funcionais que degradam polissacarídeos da parede celular vegetal. O presente trabalho teve como finalidade eliminar essas incertezas através de análises da atividade enzimática de poligalacturonase em amostras de homogeneizados intestinais de *C. maculatus*.

Nossos resultados mostraram que a poligalacturonase está de fato presente no intestino destes carunchos, corroborando com os dados publicados por Pauchet *et al.* (2010) e Nogueira *et al.* (2012). Quando ensaiados os conteúdos intestinais de *C. maculatus*, estes foram capazes de degradar o substrato PGA no teste de difusão radial e os diâmetros dos halos de atividade foram proporcionais às quantidades de amostra aplicada (Figuras 9 e 11), concordando com os resultados encontrados por Kirsh *et al.* (2012) em ensaios com homogeneizados intestinais da larva de *Phaedon cochleariae* (outro representante da família Chrysomelidae) contra outros substratos celulolíticos.

Com este resultando em mãos surgiu a dúvida quanto à origem da atividade enzimática detectada. Não estava claro se era proveniente de enzima secretada pelo animal ou se derivava da semente ingerida pelo inseto, que poderia estar infectada por microorganismos, como fungos, que são capazes de secretar enzimas de degradação da parede celular vegetal (D'OVIDIO *et al.*, 2003). Para esclarecer essa suspeita, foi preparado um extrato da farinha do feijão que as larvas ensaiadas consomem e esta amostra foi aplicada na mesma quantidade do homogeneizado de intestino no teste de difusão radial contra PGA. Com a formação do halo de atividade apenas no poço que continha o homogeneizado de intestinos, confirmamos que a atividade vista no ensaio anterior era resultante de enzimas do caruncho (Figura 11).

Confirmada a atividade de poligalacturonase nas amostras de *C. maculatus*, decidimos estudar a distribuição espacial da enzima no intestino do inseto dosando os açúcares redutores pelo método DNS. Para otimizar o protocolo, que envolveu muita experimentação do tipo tentativa e erro, decidimos primeiramente definir o melhor tampão para detectar as atividades e determinar o pH ótimo da enzima. Foram testados 3 tampões em 4 tempos diferentes e as atividades calculadas. O tampão citrato-fosfato mostrou-se o mais eficiente para realizar as análises, com atividade ótima no pH 6,5, apresentou 17% mais atividade que o tampão acetato de sódio, cuja atividade ótima ocorreu no pH 5,5. O tampão fosfato se mostrou o menos eficaz, com 72% menos atividade que o citrato-fosfato para o mesmo pool de amostra, ocorrendo sua atividade ótima no pH 8,0 (Figura 7). O ensaio foi realizado em diferentes temperaturas (dados não mostrados), sendo 37°C considerada a mais adequada.

Com as informações sobre as melhores condições para o ensaio, partimos para a determinação da atividade de poligalacturonase nos homogeneizados de epitélio e conteúdo. A amostra do conteúdo luminal apresentou 3 vezes mais atividade absoluta que a média das frações do epitélio, demonstrando que a poligalacturonase é uma enzima solúvel luminal, ou seja, é secretada no lúmen intestinal do inseto (Tabela 1). Silva e colegas (1999) analisaram as atividades enzimáticas de uma ampla gama de enzimas digestivas em *C. maculatus*. A amilase, uma enzima essencial para o processo de digestão do animal, apresentou atividade absoluta de 624 mU/animal no conteúdo luminal e atividade relativa de 16.088 mU/mg de proteína, enquanto em nosso estudo encontramos 29 mU/animal de atividade absoluta e 178.4 mU/mg de

proteína como atividade relativa no mesmo compartimento do intestino. Comparativamente, nossos resultados mostram valores muito baixos tanto para atividade absoluta, quanto para a relativa, o que significa que provavelmente a poligalacturonase não é crucial para o processo de digestão de *C. maculatus*. Sendo assim, também não constitui um modelo alvo interessante a ser explorado pelo setor de biotecnologia no desenvolvimento de combustíveis renováveis.

Com a finalidade de testar se a baixa atividade encontrada no ensaio anterior não era influenciada pela presença de inibidores no grão de feijão, foi separado um grupo de larvas para serem alimentadas com uma dieta seguramente sem inibidores, porém, as larvas recusaram o desafio proposto e a comparação se tornou inviável.

Comprovada a efetividade enzimática, resolvemos investigar a quantidade de isoformas secretadas por *C. maculatus* e o efeito do pH nessas atividades. Amostras de homogeneizados intestinais foram aplicados em gel de eletroforese (SDS-PAGE) e apenas duas isoformas foram identificadas, divergindo do número proposto por Pauchet *et al.* (2010) e Nogueira *et al.* (2012) nas análises do transcriptoma e proteoma da espécie. Para a primeira isoforma foi observada atividade do pH 3,0 até o 5,0, sendo 4,0 o pH ótimo. Para a segunda, atividade foi detectada entre os pHs 3,5 e 4,5, com maior atividade no pH 4,0 (Figura 8). Para avaliar a veracidade destes resultados, seria necessário excisar as bandas do gel e sequenciá-las, o que nos garantiria quais das sequências relatadas no transcriptoma e no proteoma correspondem às enzimas aqui ensaiadas. No entanto, não dispusemos de tempo para finalizar esta etapa, que deverá ser concluída assim que possível, buscando a validação e ampliação dos resultados encontrados.

Por ser comum a presença de genes codificadores de enzimas de degradação da parede celular de plantas (plant cell wall degrading enzymes - PCWDEs) entre membros da família Chrysomelidae resolvemos testar se o conteúdo intestinal de *C. maculatus* também apresentaria atividade enzimática para outra enzima de degradação da parede celular vegetal, a pectinase (PAUCHET et al., 2010; VATANPARAST et al., 2012). Repetindo o teste de difusão radial utilizando a pectina como substrato, encontramos halos de atividade com o mesmo padrão visto anteriormente para poligalacturonase, em que os poços com mais amostra aplicada apresentaram halo maior (Figura 13), semelhante ao que foi descoberto por Kirsh e colaboradores (2012) ao ensaiar homogeneizados de intestinos de *P. cochleariae* com o mesmo substrato, constituindo um novo campo a ser extensivamente explorado no âmbito das enzimas celulolíticas.

7. CONCLUSÕES

As análises no homogeneizado intestinal de *Callosobruchus maculatus* demonstraram atividade enzimática de poligalacturonase, conforme evidenciado nos ensaios de difusão radial contra PGA e nas dosagens dos açúcares redutores pelo método DNS, sendo a enzima solúvel luminal. Dentre os tampões testados, o citrato-fosfato se mostrou o mais adequado para os ensaios de dosagem dos açúcares redutores, com maior atividade no pH 6,5.

Ao contrário do observado no transcriptoma e no proteoma de *C. maculatus*, apenas 2 isoformas de poligalacturonases foram detectadas no homogeneizado intestinal da espécie através de eletroforese, sugerindo que nem todos os genes detectados são realmente expressos ou que os produtos gênicos não apresentam atividade enzimática de poligalacturonase.

Além da poligalacturonase, atividade de pectinase também foi detectada nas amostras de homogeneizados intestinais através do teste de difusão radial contra pectina, demonstrando a presença de outra enzima de degradação de parede celular vegetal.

Em conclusão, este estudo revela que a poligalacturonase está entre o amplo espectro de enzimas digestivas de *C. maculatus*, mas as baixas atividades, absoluta e específica, revelam que esta enzima provavelmente não é fundamental para o processo de digestão destes insetos. Por não ser uma espécie boa produtora de poligalacturonases, esta não se encaixa como foco de estudos biotecnológicos para o desenvolvimento do etanol de segunda geração.

8. PERSPECTIVAS

Apesar deste estudo ter revelado alguns dados significativos para o esclarecimento da importância das poligalacturonases para o caruncho *Callosobruchus maculatus*, ainda se fazem necessárias análises que contemplem a caracterização destas enzimas, através de estudos cinéticos.

Além disso, é imprescindível a realização do sequenciamento das bandas detectadas no gel de eletroforese, para confirmar que sequências do transcriptoma e do proteoma estão sendo expressas.

REFERÊNCIAS

- AHN, J.-E.; GUARINO, L. A.; ZHU-SALZMAN, K. Seven-up facilitates insect counter-defense by suppressing cathepsin B expression. **FEBS Journal**, v.274, p. 2800–2814, 2007.
- AHN,J.-E.; ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 678–685, 2009.
- ALSTAD, D.N., ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, v. 268, n. 5219, p. 1894-1896, 1995.
- BIFANO, T.D.; SAMUELS, R.I.; ALEXANDRE, D.; SILVA, C.P. Host-mediated induction of α -amylases by larvae of the mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (coleoptera: chrysomelidae: bruchinae) is irreversible and observed from the initiation of the feeding period. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 74, n. 4, p. 247–260, 2010.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Organização das Nações Unidas**. Disponível em: <http://www.onu.org.br/>. Acesso em: 28 janeiro, 2013
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T; LOMBARD, V.; *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource forGlycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233–238, 2009.
- CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
- CHI, Y.H.; SALZMAN, R.A.; BALFE, S.; AHN, J.-E.; SUN, W.; MOON, J.; YUN, D.-J.; LEE, S. Y.; HIGGINS, T. J. V.; PITTENDRIGHM B.; MURDOCK, L. L.; ZHU-SALZMAN, K. Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin –

costs and benefits of counter-defence. **Insect Molecular Biology**, v.18, n. 1, p. 97–110, 2009.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850 – 861, 2005.

CREDLAND, P.F. Effect of host availability on reproductive performance in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchinae). **The Journal of Stored Products Research**, v. 22, n. 1, p. 49-54, 1987.

DE ROBERTS, E.M.F, HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

DOMENICHINI, G. Contributo alla conoscenza del *Callosobruchus maculatus* F. e dei suoi parassiti. **Bulletino di Zoologia Agriculture e Bach**, v. 17, n. 2, p. 101-122, 1951.

DOOSTDAR, H.; MCCOLLUM, T. G.; MAYER, R. T. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from the gut of west – indies sugarcane rootstalk borer weevil (*Diaprepes abbreviatus* L.) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118 B, n. 4, p. 861–867, 1997.

D'OVIDIO, R.; MATTEI, B.; ROBERTI, S.; BELLINCAMPI, D. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant–pathogen interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, n. 2, p. 237– 244, 2004.

FREIRE-FILHO, F.R. **Origem, evolução e domestificação do caupi** (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Em, ARAÚJO, J.P.P. DE; WATT, E.E.; O Caupi no Brasil. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP/ Ibadan: IITA, p. 25-46, 1988.

GATEHOUSE, A.M.R. **Antinutricional proteins in plants**. Em HUDSON, B.J.F; Developments in Food Proteins. Londres: Elsevier, v. 3, p. 245-293, 1984.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

JACKAI, L.E.N.; DAOUST, R.A. Insect pests of cowpeas. **Annual Review of Entomology**, v. 31, p. 95-119, 1986.

JUGE N. Plant protein inhibitors of cel wall degrading enzymes. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 359- 367, 2006.

KIRSCH, R.; WIELSCH, N.; VOGEL H.; SVATOS, A.; HECKEL, D.G; PAUCHET,Y. Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. **BMC Genomics**, v. 13, n. 587, 2012.

KOO, Y. D; AHN, J. -E.; SALZMAN, R. A; MOON, J.; CHI, Y.H.; YUN, D.-J.; LEE, S.Y.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defence protein. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 3, p. 235–245, 2008.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 1064–1073, 2009.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. 1. ed. Cambridge: Champmen & Hall, 1996.

MICHAUD, D., BERNIER-VADNAIS, N., OVERNEY, S., YELLE, S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (coleoptera: chrysomelidae). **Insect Biochemistry Molecular and Biology**, v. 25, n. 9, p. 1041-1048, 1995.

MOSOLOV, V.V., GRIGOR'EVA, L.I., VALUEVA, T.A. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, p. 115–123, 2001.

NOGUEIRA, F. C. S; SILVA, C. P.; ALEXANDRE, D.; SAMUELS, R.; SOARES, E. L.; ARAGÃO, F. J. L.; PALMISANO, G.; DOMONT, G. B.; ROEPSTORFF, P.; CAMPOS, F. A. P. Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae:

Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **Proteomics**, n. 12, p. 2704–2715, 2012.

ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, F.M.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and cofermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400. **Journal of Biotechnology**, v.126, p. 488-498, 2006.

OLIVEIRA, G. B. Arquivo pessoal, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.E.; SOCCOL, V.T. Biotechnological Potential of Agro-industrial Residues I: Sugarcane Bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANIZZI, A. R. **Insect bioecology and nutrition for integrate pest management: Contemporary topics in entomology series**. [S.l]: CRC Press, 2012.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; CHAUHAN, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Diversity of beetles genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15635 , 2010.

PEDRA, J. H. F.; BRANDT, A.; WESTERMAN, R.; LOBO, N.; LI, M.; ROMERO-SEVERSON, J.; MURDOCK, L. L.;PITTENDRIGH, B. R. Transcriptome analyses of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and α -amylases associated with food breakdown. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 405-412, 2003.

RAMALHO, F. S; DIAS, J. M. Efeitos de Hospedeiros Alternativos na Biologia de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae), Parasitóide de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 305-310, 2003.

RAVEN, P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REDDEN, R. I.; DOBIE, P.; GATEHOUSE, A. M. R. The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) I Analyses of parental, F1,F2,F3 and Backcross

seed Generations. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 34, p. 681-695, 1983.

RUPPERT, E. E; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Rocca, 2005.

SANTOS, J. H. R.; Aspectos da biologia do *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Col., Bruchidae) sobre sementes de *Vigna sinensis* Endl., 1971.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; G. DE SA', M.F.; SAMUELS, R.I.; ISEJIMA, E.M.; BIFANO, T.D.; ALMEIDA, J.S. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 1283–1290, 2001.

SILVA, C. P.; TERRA W. R.; XAVIER-FILHO, J.; G. DE SÁ, M. F.; ISEJIMA, E. M.; DAMATTA, R. A.; MIGUENS, F. C.; BIFANO, T. D. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 41–50, 2001.

SILVA, C. P.; TERRA, W.R.; XAVIER-FILHO, J.; G. DE SA', M.F.; LOPES, A.R.; PONTES, E.G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 355–366, 1999.

SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 529–533, 1991.

SINGH, S.R; RACHIE, K.O. **Cowpea, research , production and utilization**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.

TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 675-734, 1988.

TERRA W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 181-200, 1990.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes—properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, n. 109, p.1–62, 1994.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. Digestive system. In **Encyclopedia of Insects**. 2 ed. [S.l]: Elsevier, 2009.

TERRA, W.R., FERREIRA, C., BIANCHI, A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 487-494, 1979.

TORTORA, J.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VATANPARAST, M.; HOSSEININAVEH, V.; GHADAMYARI, M.; SAJJADIAN, S.M. Pectinase and cellulase activity in the digestive system of the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.15, p. 555–561, 2012.

VATS, L.K. Alimentary canal in bruchid larvae (Bruchidae: Coleoptera). **Research Bulletin of the Panjab University**, v. 27, p. 103–106, 1976.